

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz
Leitung: Prof. Dr. med. G.W. Korting

**UNTERSUCHUNGEN VON
METHODEN ZUR CARNITINBESTIMMUNG
IM SEMINALPLASMA**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Würde des Doktors der Zahnmedizin
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Christian Rathe
aus Wetzlar

Mainz 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz
Leitung: Prof. Dr. med. G.W. Korting

**UNTERSUCHUNGEN VON
METHODEN ZUR CARNITINBESTIMMUNG
IM SEMINALPLASMA**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Würde des Doktors der Zahnmedizin
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Christian Rathe
aus Wetzlar

Mainz 1982



Dekan: Professor Dr. med. K.H. Bägler

1. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. B. Morsches

2. Gutachter: Dr. P. Schramm

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1982

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Carnitin und seine Rolle beim Fettsäuretransport durch die Mitochondrienmembran und damit bei der β -Oxidation der Fettsäuren	1
1.2	Orte der Biosynthese von Carnitin	4
1.3	Die Bedeutung von Carnitin im biologischen Material	5
1.4	Die Bedeutung von Carnitin in der Fertilität	5
2.	EXPERIMENTELLER TEIL	11
2.1	Methoden zur Bestimmung von Carnitin	11
2.1.1	Gaschromatographische Methode (LEWIN et al)	11
2.1.2	Carnitinbestimmung nach der Thiokinase-Methode (PEARSON et al)	12
2.1.3	Carnitinbestimmung nach der DTNB-Methode (PEARSON et al)	14
2.1.4	Fluorimetrische Methode zur Bestimmung von Carnitin (BROOKS et al)	16

2.1.5	Radioisotopische Methode zur Bestimmung von Carnitin (MC GARRY und FOSTER)	17
2.1.6	Radioisotopische Methode zur Bestimmung von Carnitin (PARVIN und PANDE)	18
2.1.7	Mikrobiologische Methode zur Bestimmung von Carnitin (TRAVASSOS und SALES)	19
2.1.8	Chemische Methode zur Bestimmung von Carnitin (WALL et al)	19
2.2	Verwendete Methoden zur Carnitinbestimmung und Problemstellung	20
2.2.1	Die DTNB-Methode (PEARSON und TUBBS)	20
2.2.2	Radioisotopische Methode zur Bestimmung von Carnitin (MC GARRY und FOSTER)	25
2.2.3	Radioisotopische Methode zur Bestimmung von Carnitin (PARVIN und PANDE)	27
3.	DISKUSSION	33
4.	LITERATURVERZEICHNIS	36

1. EINLEITUNG

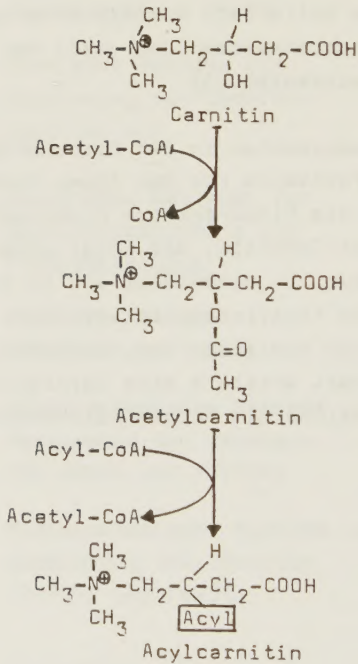
Carnitin (3-Hydroxy- 4 trimethylamino-buttersäure) und seine o-Acetyllester finden sich sowohl in vielen tierischen Geweben - hier zum ersten Mal 1905 aus Muskel-extrakten isoliert - als auch in Pflanzen und Hefen (1, 2, 3, 4).

1.1 Carnitin und seine Rolle beim Fettsäuretransport durch die Mitochondrienmembran und damit bei der β -Oxidation der Fettsäuren (5).

Da der oxydative Fettsäureabbau in den Mitochondrien stattfindet, muß die Fettsäure für den Abbau zunächst aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien hineingelangen. An diesem Transport ist Carnitin, das unter anderem in der Skelettmuskulatur, im Herzmuskel und in der Leber zum Teil auch als Acetylcarnitin vorliegt, maßgeblich beteiligt. Durch Austausch des Acetylrestes gegen einen Fettsäurerest entsteht eine Carnityl-fettsäureverbindung, welche die Mitochondrienmembran zu passieren vermag.

Abb. 1

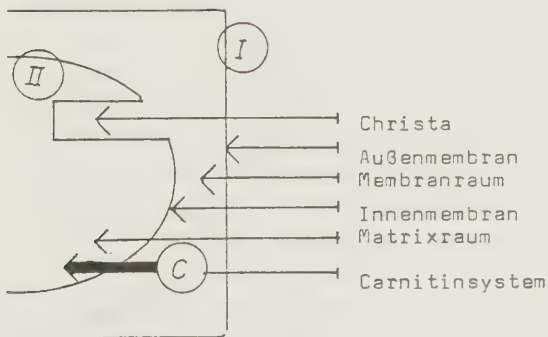
Bildung einer Carnitin-aktivierten Fettsäure



In der Außenmembran des Mitochondriums werden bevorzugt ATP-abhängige, langkettige Fettsäuren aktiviert (I); im Matrixraum ATP- und GTP-abhängige, kurzkettige Fettsäuren. Im Membranraum werden die Thioester von einer Transferase auf Carnitin übertragen, wodurch das Acylcarnitin entsteht. Katalysiert wird dieser Vorgang einmal durch die Palmitoylcarnitinacetyltransferase (6, 7, 8, 9), die eine weite Spezifität für Acylkettenlängen von C 8 bis zu C 18 hat. Eine andere Transferase, die Carnitinacetyltransferase, setzt bevorzugt eine Acylkettenlänge von C 2 bis C 10 um (10).

Abb. 2

Aufbau der Mitochondrienmembran



Auf diese Weise erklärt sich die fördernde Wirkung des Carnitins auf die Fettsäureoxidation (11, 12, 13, 14).

Nach dem Eintritt in das Mitochondrium wird die Fettsäure von dem Acylcarnitin abgespalten, und das Carnitin steht erneut für den Fettsäuretransport zur Verfügung.

Der mitochondriale Fettsäureabbau ist reversibel, kann also bei Umkehr auch als System der Fettsäuresynthese fungieren und arbeitet hierbei wiederum mit den Enzymen des Fettsäureabbaus.

In vitro konnte CASILLAS (15) nachweisen, daß Nebenhodenspermatozoen, die reichlich Carnitin enthalten, Fettsäuren verstoffwechseln. Auch andere Autoren zeigen in ihren Arbeiten, daß Spermien in vitro Lipide synthetisieren oder Fettsäuren in vorhandene Lipide einbauen können (16, 17, 18, 19), obwohl dies nicht in vivo nachgewiesen werden konnte (20).

1.2 Orte der Biosynthese von Carnitin

HORNE und BROQUIST (21) haben den Beweis erbracht, daß in der Neurospora die Biosynthese von Carnitin durch eine Serie von Reaktionen geschieht, in der es zur Bildung von ϵ -N-Trimethyllysin aus Lysin durch Methylgruppeneaufnahme kommt, das dann durch Abspaltung der Kohlenstoffatome 1 und 2 zu γ -Butyrobetain (4-N-Trimethylamino-Buttersäure) umgewandelt wird. Die Hydroxylierung dieser Verbindung auf der β -Position ergibt das Carnitin.

Zudem haben BROQUIST und TAMPHAICHITR (22, 23) die Leber als einen Ort der Carnitinbiosynthese mit eingeschlossen und haben darüberhinaus angedeutet, daß die Bildung von Carnitin aus seinem unmittelbaren

Vorläufer, γ -Butyrobetain, auf Leber, Muskeln, Herz und Testis beschränkt ist. Die oben aufgezählten Gewebe, sowie braunes Fettgewebe, haben hohe Konzentrationen von Transferase, Carnitin und Acetylcarnitin und die Mitochondrien dieser Gewebe zeigen in vitro eine starke Erhöhung der Oxidation langkettiger Fettsäuren bei Zugabe von Carnitin (24, 25).

So ist es nicht Überraschend, daß Studien über die Verteilung von Carnitin in verschiedenen Geweben ergeben haben, daß allgemein die höchsten Carnitinkonzentrationen in Geweben gefunden werden, deren Fettsäureoxidation durch Carnitin maximal angeregt wird (15).

1.3 Die Bedeutung von Carnitin im biologischen Material

Schwankungen im Carnitingehalt von biologischem Material können auf pathologische Zustände bei Tieren und Menschen hinweisen. So wurde zum Beispiel ein signifikanter Abfall von freiem Carnitin in der Milch von Kühen mit ketotischer Stoffwechsellage nachgewiesen (26). Die Sterblichkeitsrate - verschuldet durch Myocarditis bei einer Infektion mit *Corynebakterium diphtheriae* ist verbunden mit einer Fettinfiltration und einer erschöpfenden Carnitinentleerung des Herzmuskelgewebes (27). Außerdem kann Carnitin therapeutisch eingesetzt werden bei Tieren, die mit *Corynebakterien diphtheriae* Toxin geimpft worden sind (27, 28).

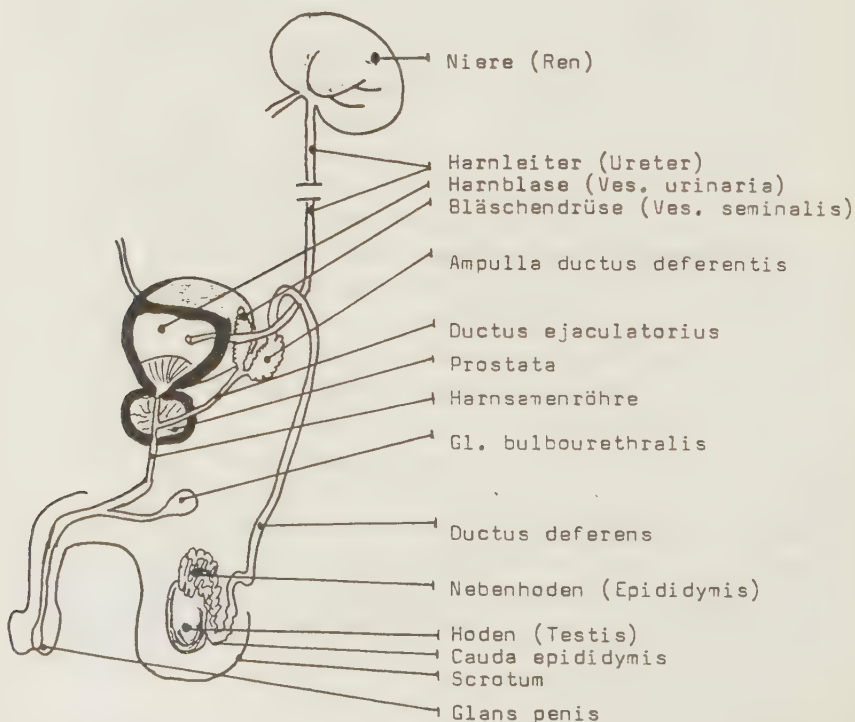
1.4 Die Bedeutung von Carnitin in der Fertilität

Auch in der Fertilität kann die Carnitinmessung im Seminalplasma ein Hinweis auf die Funktion von Bläschendrüse und Nebenhoden sein. Das heißt, die Carnitinkonzentration ist verringert, bei Funktionsstörungen

eines oder beider Organe, oder bei mechanischen Blockaden im männlichen Zeugungstrakt, bei denen die Ejakulation der Sekrete verhindert wird (29, 30). Menschliche Samenflüssigkeit besteht hauptsächlich aus Sekreten der Bläschendrüse und der Prostata, mit zusätzlichen Sekretanteilen aus den Samenröhrchen (einschließlich Spermazellen und Rete Testis Flüssigkeit), den Nebenhoden, der Vas deferens, den tubulären Schleimdrüsen der Harnröhre und der bulbourethralen Drüse (31).

Abb. 3

Die männlichen Geschlechtsorgane



Es ist nun möglich, verschiedene Substanzen aus dem Seminalplasma zu bestimmen, die dann als Parameter verwendet werden können für die verschiedenen Elemente des männlichen Zeugungstraktes. Dies wären: Fruktose für die Bläschendrüse (32), saure Phosphatase und Citrat (33, 34), ebenso das Inosit und das Enzym Gamma GT für die Prostata (35, 36), Carnitin und Glycerolphosphorylcholin (GPC) für die Nebenhoden (37, 29, 30). Mit der Carnitinmessung ist es gelungen, die letzte Lücke in der Beurteilung aller wichtigen Drüsen der männlichen Genitale für die Befruchtungsfähigkeit zu schließen. Carnitin ist reichlich vorhanden im Nebenhodengewebe verschiedener Tierspezies wie Affe, Ratte, Eber, Widder und Stier (38, 24). Ein Teil des hohen Carnitingehaltes im Nebenhoden ist in den Spermien lokalisiert (15). Ebenso haben sie eine hohe Carnitinacetyltransferase-spezifische Aktivität und es ist anzunehmen, daß der überwiegende Teil der im Hodengewebe nachweisbaren Enzymaktivität den Spermien entstammt (39).

Von den vielen Veränderungen morphologischer, physiologischer, physikalischer und metabolischer Art, die Spermatozoen während der Passage vom Hoden durch die Nebenhoden durchmachen, ist wohl die wichtigste der Erwerb der Befruchtungsfähigkeit. So sind zum Beispiel bei verschiedenen Tierspezies Spermien aus dem proximalen Caput nicht befruchtungsfähig, wohl aber caudales Sperma. Daraus ist zu schließen, daß zur Reifung des Spermas die epididymale Umgebung notwendig ist (40, 41, 42, 43).

D.E. BROOKS et al (44) sprechen von einem "Baden" der Spermien in einer Flüssigkeit, die Carnitin in hohen Konzentrationen enthält und dadurch eine Aufnahme von Carnitin ermöglicht.

Auch CASILLAS (45) sieht hier einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Carnitin - während der Passage durch die Epididymis wächst der Carnitingehalt der Spermien um das Zehnfache - und der Befruchtungsfähigkeit. Spermien aus dem Caput der Epididymis sind in vitro in der Lage, Carnitin aufzunehmen, solche aus der Cauda sind in ihrem Aufnahmevermögen durch die schon vorhandene hohe Carnitinkonzentration erschöpft.

MARQUIS et al (24) und andere Autoren (2, 46, 47, 48, 49, 50) nehmen an, daß Carnitin in den Epithelzellen des Nebenhodens gebildet wird; LEWIN et al (29) gehen in neueren Untersuchungen davon aus, daß Carnitin nicht nur im Nebenhoden, sondern auch zusätzlich in der Bläschendrüse gebildet wird. Im Gegensatz dazu stehen BROOKS und HAMILTON (51), die die Meinung vertreten, daß das Carnitin aus dem Blutstrom in den Nebenhoden konzentriert wird. Alle sind sich aber darin einig, daß die Carnitinbildung unter androgener Kontrolle steht. Carnitin konnte in Nebenhoden von kastrierten Ratten nicht gefunden werden, erreichte aber nach Zufuhr von Testosteron wieder normale Werte (24). Schon früher wurde durch Untersuchungen die androgene Abhängigkeit von anderen Substanzen der Drüsen des männlichen Genitale, wie Fruktose (52), Zitronensäure (53) und Glycerolphosphorylcholin (54) nachgewiesen. Andere Autoren kamen zu gleichen Ergebnissen, zeigten aber auf, daß im Gegensatz dazu Antiandrogene, wie Cyproteronazetat und Medroxyprogesteronazetat keinen Einfluß auf die Carnitinenreicherung im Nebenhodensekret haben (51, 44, 55). Untersuchungen über den Carnitingehalt, beziehungsweise dessen Differenzierung im Sperma beim Menschen haben FRAENKEL et al (37) vorgelegt, die bei normospermen Probanden einen Carnitingehalt von $52 \mu\text{g/ml}$ fanden. Aus dem Unterschied zum Carnitingehalt von $30 \mu\text{g/ml}$

bei vasektomierten Patienten schlossen sie, daß Über 59% des Carnitins im Sperma seinen Ursprung im Nebenhoden habe.

LEWIN et al (29) untersuchten 50 Samenflüssigkeitsproben von Patienten einer Infertilitätsklinik mit einer gaschromatographischen Methode auf ihren Carnitingehalt. Die angegebenen Werte rangieren insgesamt höher als die anderer Untersucher, die die enzymatische Methode angewendet haben. Dieser Unterschied ist wohl darauf zurückzuführen, daß bei der gaschromatographischen Methode im Gegensatz zur enzymatischen Methode freies und gebundenes Carnitin gemessen werden. Die Autoren teilten die Patienten in vier Klassen ein.

- a) Patienten mit normaler Samenbläschen- und Nebenhodenfunktion mit normalen Fruktose- und Carnitinwerten.
- b) Patienten mit defektem Nebenhoden aber funktionierender Bläschendrüse hatten bis zur Hälfte geringere Carnitinwerte bei normalen Fruktosewerten.
- c) Patienten mit defekter Bläschendrüse aber funktionierendem Nebenhoden hatten um die Hälfte reduzierte Carnitinwerte und erniedrigte Fruktosewerte.
- d) Patienten mit gestörter Funktion von Bläschendrüse und Nebenhoden hatten extrem niedrige Carnitinwerte, die etwa bei $1/5$ der Normwerte lagen.

Bestätigung dieser Thesen erhielten sie durch die Untersuchung der Carnitinverteilung im Split-Ejakulat. Im normalen Ejakulationsmechanismus enthält die erste Portion der Samenflüssigkeit die meisten Spermienzellen,

ihre begleitenden epididymalen Sekrete und das meiste der prostatistischen Flüssigkeit, während die zweite Portion des Ejakulats das meiste der vesiculären Sekrete enthält. Beide Portionen enthielten etwa gleich hohe Carnitinwerte. Ist also die Carnitinkonzentration in der ersten beziehungsweise zweiten Portion des Splits deutlich erniedrigt, so kann man auf einen verminderten epididymalen beziehungsweise vesiculären Beitrag schließen. Sind die Carnitinwerte beider Portionen gering, liegt eine verminderte Funktion des Nebenhodens und der Bläschendrüse vor. WETTERAUER und HEITE (30) fanden in ihrer Arbeit von 1976 bei Normalpersonen einen mittleren Carnitingehalt von $71 \mu\text{g/ml}$. Werte unter $40 \mu\text{g/ml}$ sahen sie als pathologisch an. Im Gegensatz zu FRAENKEL et al (37) resultierte aus ihrer Arbeit, daß über 90% des Carnitins im Sperma vorliegen. Die Korrelation des Carnitins mit anderen Spermio-graphieparametern ergab, daß hohe Spermiedichten und hoher Carnitingehalt, ebenso wie niedrige Spermiedichte und niedriger Carnitingehalt bevorzugt zusammengehören. Niedrige Motilität ist gekoppelt mit niedrigen Carnitinwerten und umgekehrt. Hohes Ejakulatvolumen zeigt bevorzugt niedrige Carnitinwerte. Für die Korrelation des Carnitins mit dem Fruktose-, Citrat- und Pyruvatgehalt des Samenplasmas sowie Auswirkungen des pH-Gehaltes auf den Carnitinwert fanden die Untersucher keine Zusammenhänge. Sie kamen daher zu dem Schluß, daß Carnitin als ein Bestandteil des Spermias anzusehen ist, der von den Funktionen der Bläschendrüse und der Prostata weitgehend unabhängig ist, was im Gegensatz zu den oben angeführten Ergebnissen von LEWIN et al (29) steht. Das führen WETTERAUER und HEITE (30) auf die von den Autoren angewendete gaschromatographische Methode zurück, die - wie schon erwähnt - auch das gebundene Carnitin mitmißt, welches in erheblichen Mengen im Bläschendrüsensekret vorkommen soll.

2. Experimenteller Teil.

2.1 Methoden zur Bestimmung von Carnitin

2.1.1 Gaschromatographische Methode (LEWIN et al, 56)

Die Methode basiert auf der Zersetzung der quaternären Ammoniumverbindung Carnitin mit NaOH bei hoher Temperatur und unter Bedingungen, die denen des Hofmann-Abbaues ähnlich sind.

Materialien:

D-L-Carnitin HCl und Acetyl-D-L-Carnitin HCl (Sigma Chemical Co, St. Louis); Palmitoyl-D-L-Carnitin HCl (Calbiochem, San Diego); 4-Butyrolacton (Merck Darmstadt); Carbowax 20M und Chromosorb W (Sopleco, Inc., Bellefonte).

Durchführung der Bestimmung:

D-L-Carnitin HCl Standardwerte (10 bis 50 μ g in 0,3 ml) werden zu einer 0,1 ml Reagenz (2,0M NaOH, das 40 mg NaBH₄/ml enthält) zugegeben und bei 160 Grad Celsius über 30 Minuten getrocknet. Nach dem Abkühlen der Probe gibt man 0,5 ml HCl (5,5M) zum Ansäuern hinzu, um überschüssiges NaBH₄ auszufällen. Die Mischung wird dann mit 0,5 ml CHCl₃ extrahiert und die Proben (0,5 μ l) dieses Extraktes separiert man in einem N₂-Trärgas (20 ml/min.) auf einer Säule (6' x 1/8 "D) von Carbowax 20M (20%) und 3% H₃PO₄ auf Chromosorb W. Sodann werden die Proben in einem Packard-Modell 803 Serie 7600 - Gaschromatographen gemessen, der mit einem H₂-Flammenionisations-Detektor ausgerüstet ist.

Carnitin bildet unter diesen Bedingungen ein Derivat, das dieselbe Retentionszeit (12 Minuten) und dasselbe Massenspektrum hat wie das von 4-Butyrolacton. Die gebildete Menge dieses Materials ist proportional der Menge des vorhandenen Carnitins.

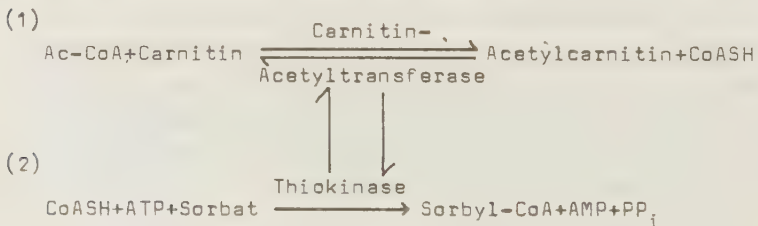
Carnitinkonzentrationen in unbekannten Proben werden durch einen Vergleich der Peak-Höhen mit korrespondierenden Peaks der Carnitinstandardkurve bestimmt. Bei der Untersuchung der menschlichen Samenflüssigkeit auf Carnitin nach der gaschromatographischen Methode wird eine besondere Vorbehandlung der Probe notwendig (LEWIN et al, 29).

Das Carnitin wird aus 0,4 ml-Portionen der Samenflüssigkeit, die durch Masturbation nach viertägiger Abstinenz erhalten wurden, durch Hinzufügen von 1,6 ml absoluten Äthanol extrahiert. Nach dem Zentrifugieren dekantiert man den Überstand und der Niederschlag wird in 2,0 ml 95%igen Äthanol gewaschen. Nach nochmaligem Zentrifugieren wird der Überstand wiederum abgeschüttet und die vereinigten Äthanolextrakte werden bei 50 Grad Celsius getrocknet. Diese Probe wird dann nach der oben beschriebenen gaschromatographischen Methode auf ihren Carnitingehalt analysiert.

2.1.2 Carnitinbestimmung nach der Thiokinase-Methode (PEARSON et al, 57)

Die Thiokinase-Methode ist hochempfindlich und wird zweckmäßig für Gewebeextrakte, aber auch zur Gehaltsbestimmung von Carnitinlösungen angewendet. Man benötigt allerdings zusätzlich gereinigte Thiokinase und das Testsystem ist relativ kompliziert.

Reaktionsgleichung



Die Zunahme von Sorbyl-CoA, gemessen an der Extinktionszunahme bei 300 nm (58), ist der Carnitinmenge proportional. Mit überschüssigem ATP und Sorbat ist die Reaktion (2) irreversibel, pH-Werte über 8,5 sollten vermieden werden, da Carnitinacetyltransferase sonst schnell inaktiviert wird (59). Auch wird das Enzym durch Metallionen stark gehemmt; der Metallgehalt von Gewebeextrakten genügt dazu häufig. Zusatz von 1,25 mM Äthylendiamin-tetraacetat verhindert diese Hemmung.

Materialien:

Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Tris; Magnesiumchlorid; Sorbinsäure (zweimal aus Wasser umkristallisiert); Salzsäure, 1N; Kalilauge, 1N; Kaliumhydrogencarbonat; Kaliumhydrogenphosphat; ATP; EDTA; 70%ige Perchlorsäure; Acetyl-CoA; Carnitinacetyltransferase; Thio-kinase.

Durchführung der Bestimmung

Das zu untersuchende gefrorene Gewebe ist im Stahlmörser zu pulvern, schnell zu wägen und zu enteiuweisen. Im gekühlten Mörser werden 2-3 ml eiskalter Perchlorsäure pro Gramm Gewebe verrieben. Nach dem Zentrifugieren versetzt man den Aliquot des Überstandes mit je 0,025 ml Phosphat-Puffer pro ml Extrakt und bringt ihn mit 1N Kalilauge auf pH = 6,5 bis 7. KClO_4 wird in der Kälte abgetrennt und der Überstand zur Analyse auf Carnitin und veresterte Carnitine verwendet.

Meßstrahlung: 300 nm;

Schichtdicke: 1 cm;

Testvolumen: 2,0 ml;

25 Grad Celsius; Messung gegen Luft oder Wasser.

In die Küvette werden 1,3 ml der enteiuweißten Probe sowie 0,5 ml Tris-Puffer und 0,02 ml Acetyl-CoA-Lösung

und 0,05 ml EDTA-Lösung pipettiert und mit Wasser auf 1,965 ml aufgefüllt. Danach gibt man 0,025 ml Thiokinase-Lösung hinzu. Nach circa fünf Minuten liest man den ersten Extinktionswert (E_1) ab und pipettiert sofort 0,01 ml Carnitinacetyltransferase dazu, mischt durch und liest nach circa 10 bis 15 Minuten die Extinktion ab (E_2). Es ist darauf zu achten, daß die Meßtemperatur 25 Grad Celsius unbedingt eingehalten wird.

2.1.3 Carnitinbestimmung nach der DTNB-Methode (PEARSON et al, 57)

Die DTNB-Methode war relativ wenig empfindlich, aber einfach und schnell durchzuführen. Sie ist eigentlich die Methode der Wahl zur Analyse für Gehaltsbestimmungen von Carnitinlösungen. Ihre Brauchbarkeit zur Messung des Carnitingehaltes in Geweben ist dadurch begrenzt, daß Gewebeextrakte unter Umständen DTNB-reduzierende Stoffe enthalten. Diese können vor der Enzymreaktion die Extinktion zu stark erhöhen. MARQUIS und FRITZ (60) haben empfohlen, diesen Effekt durch fünfminütiges Erhitzen des enteiweißten Extraktes bei pH = 8,5 auf 90 Grad Celsius auf ein Minimum zu reduzieren; störende Thiole werden dabei oxidiert. Doch tritt bei Erhitzung selbst in mildem Alkali eine deutliche Hydrolyse von Acetylcarnitin ein.

Materialien:

5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) DTNB; alle weiteren benötigten Reagenzien unter Weglassung der Thiokinase-Lösung wurden bereits in der vorangegangenen Thiokinase-Methode aufgezählt.

Durchführung der Bestimmung

Meßstrahlung: 412 nm

Schichtdicke: 1 cm

Testvolumen: 2,0 ml

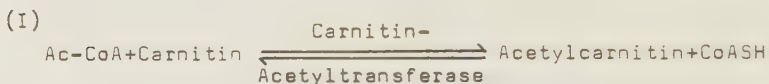
Raumtemperatur; Messung gegen Luft.

In die Küvette werden 1,6 ml enteiweißte und neutralisierte Probe gegeben, sowie 0,2 ml Tris-Puffer, 0,025 ml DTNB-Lösung, Acetyl-CoA-Lösung 0,02 ml und 0,05 ml EDTA-Lösung. Den Ansatz füllt man mit Wasser auf 1,99 ml auf. Danach wird die Extinktion (E_1) abgelesen. Anschließend werden 0,01 ml Carnitinacetyltransferase zugegeben und nach weiteren fünf Minuten die Extinktion (E_2) abgelesen. ($E_2 - E_1 = \Delta E$) Carnitinacetyltransferase wird durch DTNB langsam inaktiviert. Nach der hier beschriebenen Vorschrift sollte die Reaktion zu Ende ablaufen. Sollten unwahrscheinlich niedrige Carnitinwerte erhalten werden, so ist erneut Enzym beizugeben. Die hier beschriebene Methode wurde 1976 mit geringfügigen Änderungen von WETTERAUER und HEITE (30) zur Messung von Carnitin in menschlichem Ejakulat verwendet. Der Vorgang der Behandlung der Samenflüssigkeit nach WETTERAUER und HEITE vor der Untersuchung auf Carnitin wird später beschrieben.

DAWSON und ROLANDS geben eine andere Vorbereitung der Spermaproben für die Carnitinbestimmung an (61). Der Samen wird mit 5 Vol. Äthanol gefällt, zentrifugiert und das klare Wasser-Äthanol-Extrakt unter reduziertem Druck bei 40 Grad Celsius getrocknet. Der Rückstand wird in 2 ml destilliertem Wasser gelöst und in 3 ml einer Mischung, die 2 Vol. Chloroform und 1 Vol. Isobutanol enthält, gegeben. Nach dem Mischen zentrifugiert man die Lösung mit 3000 x g für 10 Minuten und nutzt die obere wässrige Schicht für die enzymatische, beziehungsweise kolorimetrische Carnitinbestimmung.

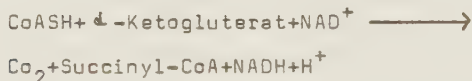
2.1.4 Fluorimetrische Methode zur Bestimmung von Carnitin (62)

Hochempfindliche Carnitinbestimmungen können mit Hilfe der Δ -Ketoglutarat-Dehydrogenase als Indikator-enzym durchgeführt werden. Das nach Reaktion (I) mit Carnitinacetyltransferase entstehende CoASH



reagiert wie folgt weiter

(II)



Ein Äquivalent CoASH ergibt in diesem System ein Äquivalent NADH_2 . Die NADH_2 -Mengen können nach der Methode von TUBBS und GARLAND (63) fluorimetrisch bestimmt werden. SHEPERD et al (64) beschrieben die Brauchbarkeit dieser Methode um Carnitinnengen in mitochondrialen Inkubationsmischungen zu bestimmen, erwähnten aber nicht, ob eine Anwendung dieser Methode auf Gewebeextrakte sinnvoll sei. BROOKS et al (51) wendeten 1973 diese von TUBBS und GARLAND (63) entwickelte Methode in modifizierter Form an, um Carnitin fluorimetrisch in der epididymalen Flüssigkeit zu bestimmen.

Die Komponenten des Versuchsansatzes (3 ml) waren hier:

0,1M-Pottaschephosphat pH = 7,2; 1mM MgCl_2 ; 0,5mM EDTA; 0,2mM Dithiothreitol; 0,5mM 2-Ketoglutarat und 0,1mM NAD^+ . 1 μ l 15mM Acetyl-CoA wurde kurz vor der Zugabe von 2-Ketoglutaratdehydrogenase beigelegt. Carnitin

wurde am Fluoreszenzenanstieg abhängig von der Carnitinacetyltransferase-Zugabe gemessen.

2.1.5 Radioisotopische Methode zur Bestimmung von Carnitin (MC GARRY und FOSTER, 65)

Die hier beschriebene radioisotopische Bestimmungsmethode von Carnitin stellt eine Vereinfachung der zuerst von CEDERBLAD und LINDSTEDT (66) entwickelten und von BOHMER et al (67) modifizierten Methode dar. Die Versuchsanordnung erlaubt eine schnelle Bestimmung von freiem und verestertem Carnitin in kleinem Volumen und befreit von der Notwendigkeit einer vorherigen Deproteinisierung der Probe. Die Carnitinprobe wird mit ($1\text{-}^{14}\text{C}$) Acetyl-CoA von bekannter spezifischer Aktivität und Carnitinacetyltransferase versetzt. Das gebildete, markierte Acetylcarnitin wird von dem nicht umgesetzten ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Acetyl-CoA durch ein Anionen-Austauscher-Harz getrennt und die Radioaktivität der Probe gemessen. Es wird die Menge von gebildetem ($1\text{-}^{14}\text{C}$) Acetylcarnitin (nicht absorbiert durch das Harz) stöchiometrisch in Beziehung gesetzt zu dem Betrag von vorhandenem Carnitin.

Materialien:

L-Carnitin (Gibco, Grand Island, New York); D-L-(methyl $^{14}\text{-C}$) Carnitin (Amersham, Searle, Arlington Heights); Acetyl-L-Carnitin und Acetyl-CoA wurden nach den Methoden von BREMER (68) und STADTMAN (69) hergestellt; ($1\text{-}^{14}\text{C}$) Acetyl-CoA (spezifische Aktivität 55 mCi/mmol, New England Nuclear, Boston); Natriumtetrathionat (ICN Pharmaceuticals Inc., Plainview, New York); Dowex 1-X 10 Cl^- (200-400 mesh, Baker Chemical Co, Phillipsburg); Carnitinacetyltransferase (Boehringer Mannheim).

Durchführung der Bestimmung

Die basische Reaktionsmischung enthält in einem Volumen von 1,05 ml: 120 μ mol Tris-HCl Puffer pH = 7,3; 2 μ mol Natriumtetrathionat; 25 nmol (0,025 μ Ci)(1-¹⁴C)-Acetyl-CoA und die zu analysierende Probe (0,05 ml). Drei Carnitinstandards (2,5; 5,0 und 10,0 nmol) laufen bei jeder Serie der Testproben mit. Die Reaktion wird eingeleitet durch die Zugabe von 5 μ l Carnitin-acetyltransferase. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur 30 Minuten stehengelassen. Nach dieser Zeit werden 0,3 ml einer fortlaufend gerührten Dowex 1-X 10-Lösung (Anionen-Austauscher-Harz) zugefügt und nach dem Aufschütteln in Eis gestellt. Dieser Schritt wird zweimal in 10-Minuten-Abständen wiederholt. Danach werden die Proben zentrifugiert und 0,5 ml der überstehenden Flüssigkeit mit 10 ml Aquasol gemischt. Die enthaltene Radioaktivität wird in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler bestimmt.

2.1.6 Radioisotopische Methode zur Bestimmung von Carnitin (PARVIN und PANDE, 70)

Eine weitere radioisotopische Bestimmungsmethode für Carnitin ist von PARVIN und PANDE (70) angegeben worden. Sie unterscheidet sich im wesentlichen von der vorher beschriebenen Methode durch eine andere Trennung von (1-¹⁴C) Acetylcarnitin von (1-¹⁴C) Acetyl-CoA. Der Ablauf dieser Versuchsanordnung, sowie die verwendeten Materialien werden später aufgeführt.

Zwei weitere Methoden sollten kurz erwähnt werden.

2.1.7 Mikrobiologische Methode zur Bestimmung von Carnitin (TRAVASSOS und SALES, 71)

Keine Mikroorganismen außer den wildwachsenden Mutanten von *Torulopsis bovina* (Hefeart, 72) benötigen Carnitin

als einen essentiellen Faktor. Diese Mutanten brauchen das Carnitin, da sie "undicht" sind, das heißt sie können das selbstgebildete Carnitin nicht festhalten (73). Dadurch ist es möglich, das Wachstum von *T.bovina* in Beziehung zu setzen zu der Menge des von außen zugeführten Carnitins. Diese Hefemethode übertrifft in ihrer Spezifität nicht die enzymatische Methode, da *T.bovina* auf beide, freies und sogar besser auf verestertes Carnitin, reagiert (74). Aber sie ist genauer, denn es können Carnitinmengen von 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ gemessen werden.

2.1.8 Chemische Methode zur Bestimmung von Carnitin (WALL et al, 75)

Modifiziert nach ROCHA und MIRANDA.

Proben zur Carnitinbestimmung werden bei 60-70 Grad Celsius getrocknet. Der Rückstand wird in 2 ml absolutem Äthanol und 0,5 ml Acetylchlorid gegeben. Die Veresterung wurde bei 75 Grad Celsius durchgeführt. Die Lösungen läßt man sodann bei 60-70 Grad Celsius verdampfen, um das Äthanol, Äthylazetat und HCl, die letzten zwei werden bei der Reaktion gebildet, zu eliminieren. Die Rückstände werden mit 0,5 ml Perjodat (75, 76) unter Schütteln zur Reaktion gebracht und man fügt 2 ml kaltes Wasser hinzu. Danach wird das Perjodat mit 5 ml Äthylendichlorid unter N_2 -Atmosphäre extrahiert. Die Absorption der Äthylendichlorid-Lösung wird bei 365 nm bestimmt.

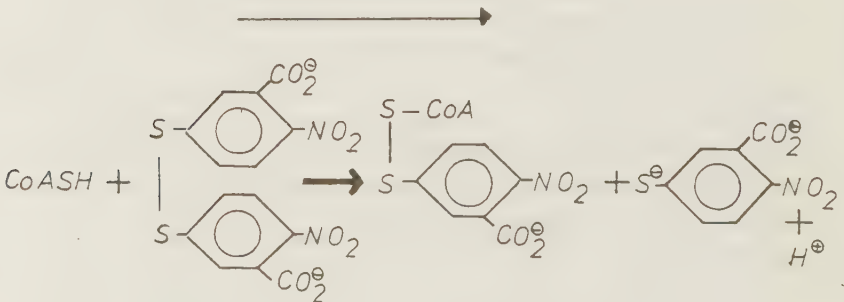
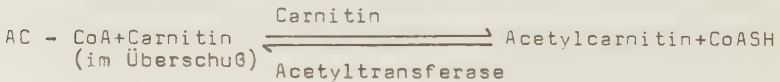
2.2 Verwendete Methoden zur Carnitinbestimmung und Problemstellung

2.2.1 Die DTNB-Methode (PEARSON und TUBBS, 57)

Untersuchungen über den Carnitingehalt von Spermaproben wurden im Labor der Universitäts-Hautklinik Mainz nach der wohl zur Zeit gebräuchlichsten DTNB-Methode (5-5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat)) von PEARSON und TUBBS (57) durchgeführt. Die Vorbehandlung der Proben wurde wie bei WETTERAUER und HEITE (30) gehandhabt. Die Spermaproben wurden vom Patientengut in der Abteilung für Andrologie durch Masturbation nach vier Tagen Abstinenz erhalten. Es wurde nur die gesamte Samenflüssigkeit, kein Split-Ejakulat verwendet.

Bestimmung von Carnitin nach der DTNB-Methode

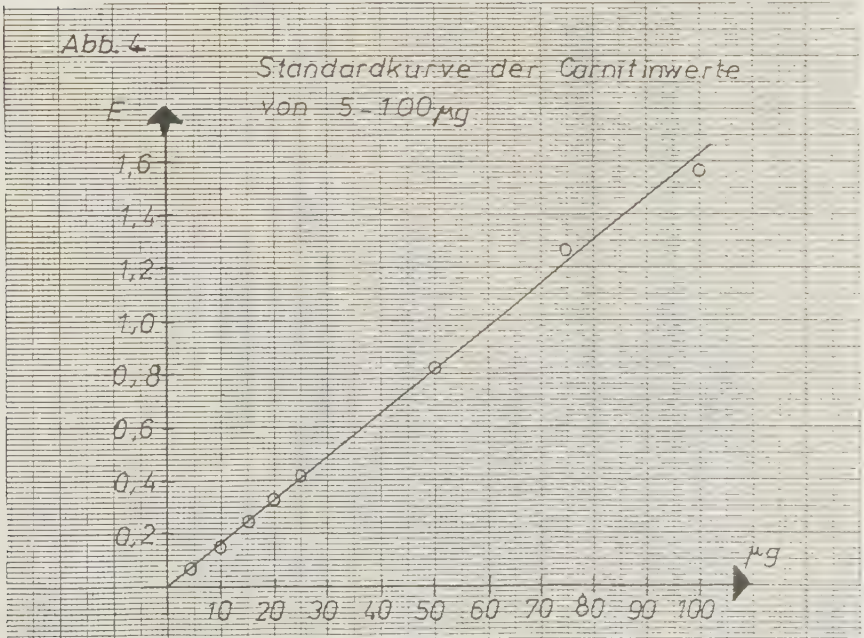
Reaktionsgleichung



Nach enzymatischer Reaktion entstandenes CoASH reagiert nichtenzymatisch mit DTNB unter Bildung des gelben 5-Thio-2-nitrobenzoats. Dieses absorbiert stark bei 412 nm. Doch fanden WETTERAUER und HEITE (30), daß die Absorption von DTNB bei 405 nm derjenigen von 412 nm entspricht. MARQUIS und FRITZ (77) zeigten 1966, daß das gebildete CoA der Carnitinmenge direkt proportional ist.

Dieses Verfahren wird geringfügig durch pH-Verschiebungen beeinflusst. pH = 8,5 darf nicht überschritten werden, weil sonst die Carnitinacetyltransferase inaktiviert wird; pH = 7,0 soll nicht unterschritten werden, da anderenfalls eine ungenügende Dissoziation des Farbstoffes 5-Thio-2-nitrobenzoat zu erniedrigten Meßwerten führt. Auch hier muß EDTA bei Messungen in Gewebeextrakten zugesetzt werden (78, 79).

Abbildung 4 zeigt die Standardkurve für Carnitinwerte von 5 µg bis 100 µg.

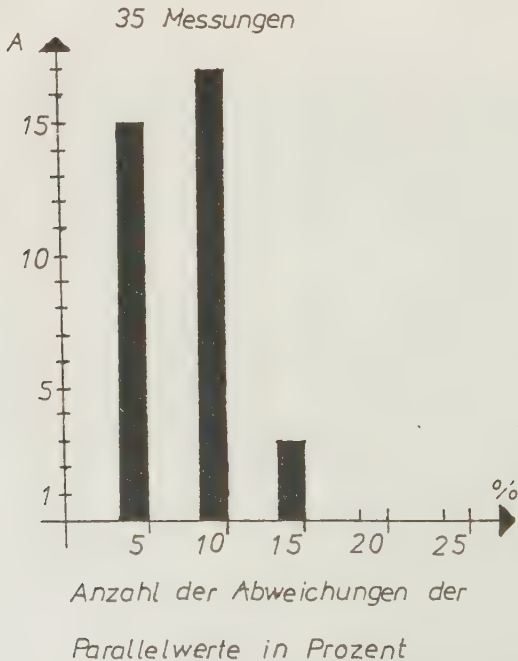


Zu Abbildung 4

Werte:	5 μ g Carnitin	→	0,075 E
	10 μ g Carnitin	→	0,155 E
	15 μ g Carnitin	→	0,245 E
	20 μ g Carnitin	→	0,330 E
	25 μ g Carnitin	→	0,420 E
	50 μ g Carnitin	→	0,820 E
	75 μ g Carnitin	→	1,265 E
	100 μ g Carnitin	→	1,570 E

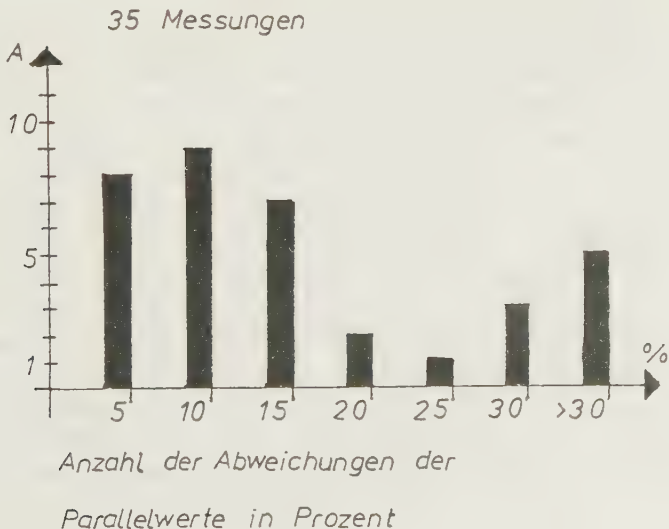
Bei dem Vergleich von Parallelwerten in diesem Meßbereich ergaben sich Abweichungen von 0 bis 15%, die sich, wie in Abbildung 5 dargestellt, verteilen:

Abb. 5



Es lagen also annähernd 8,5% der Parallelwerte über $\pm 10\%$ auseinander. Eine Schwankungsbreite, die sicherlich im Hinblick auf die erforderliche Genauigkeit der Aussage tolerierbar ist. Wurde nun für die Carnitinbestimmung biologisches Material, das heißt Seminalplasma verwendet, fiel jedoch eine erhöhte Abweichung innerhalb der Parallelmessungen auf, so daß jetzt nicht mehr 8,5% sondern 51% der Messungen über $\pm 10\%$ lagen, 23% der Messungen sogar Abweichungen von über 25% aufwiesen, was wohl doch die Aussagefähigkeit der Methode in Frage stellt (siehe Abbildung 6). Diese hohen Schwankungen bei Verwendung biologischen Materials bei der DTNB-Methode hat schon bei einigen Labors zur Aufgabe der Carnitinmessungen im Ejakulat und zur verstärkten Suche nach anderen möglichen spezifischen Substanzen, die als Parameter für die Nebenhodenfunktion angesehen werden können, geführt.

Abb.6



Die Erhöhung der Abweichungen der Carnitin-Zweitbestimmungen beim Seminalplasma gegenüber den Carnitineichlösungen wurde von uns unter anderem auch auf den Arbeitsgang der Eiweißfällung zurückgeführt, wobei starke Laugen und Säuren verwendet werden. Der Ablauf der Fällung ist folgendermaßen:

Zu 0,5 ml Sperma gibt man 2,5 ml eisgekühlte 0,6n Perchlorsäure. Nach kurzem Schütteln verbleibt das Röhrchen mindestens noch zehn Minuten im Eisbad. Danach erfolgt ein zehnminütiges Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge bei 0 Grad Celsius mit 5000 U/min. 2,0 ml des Überstandes werden zur weiteren Verarbeitung abpipettiert, der Zentrifugenrest wird verworfen. Zu dem 2,0 ml Überstand gibt man 1,0 ml 0,5M Kaliumkarbonatlösung hinzu, läßt diesen Ansatz wiederum zehn Minuten im Eisbad stehen und zentrifugiert danach nochmals wie oben angeführt.

Zusätzlich zu der durch die Eiweißfällung entstehenden Problematik gibt es Hinweise in der Literatur (59, 80, 81), daß DTNB das Carnitinacetyltransferase-Enzym inhibiert.

Es galt nun eine Methode zur Carnitinbestimmung in wäßriger Lösung zu finden, die ähnlich leicht und schnell wie die vorher beschriebene Methode arbeitet, aber ohne den Arbeitsgang zur Eiweißfällung und ohne DTNB-Einsatz auskommt.

Aufgrund der relativen Unempfindlichkeit der chemischen (75, 76) und des hohen Laboraufwandes der biologischen (92, 93) Methoden - von denen manche in der Vergangenheit schon von FRAENKEL und FRIEDMAN (1) überprüft wurden - sowie der schwierigeren Technik und des höheren Zeitaufwandes der mikrobiologischen (71, 72, 73, 74) und der nur das Totalcarnitin messenden gaschromatographischen (56) Bestimmungsmethoden für Carnitin verbleiben nur die radioisotopischen Versuche, die auf

der schnellen und zuverlässigen enzymatischen Methode (66, 67, 77) beruhen, andererseits aber ohne Enteiweißung auskommen (65).

Der Vorteil der Versuche ist auch darin zu sehen, daß hier freies Carnitin genauso wie Gesamtcarnitin (freies und verestertes Carnitin) bestimmt werden können.

2.2.2 Radioisotopische Methode zur Bestimmung von Carnitin (MC GARRY und FOSTER, 65)

Wir entschlossen uns für die 1976 von MC GARRY und FOSTER (65) beschriebene Methode, die darauf beruht - wie bereits erwähnt - daß zur Carnitinprobe ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Acetyl-CoA von bekannter spezifischer Aktivität sowie Carnitinacetyltransferase gegeben wird. Das markierte Acetylcarnitin wird nach folgender Reaktion gebildet:



Das nicht umgesetzte ($1\text{-}^{14}\text{C}$) Acetyl-CoA wird durch ein Anionen-Austauscher-Harz getrennt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler bestimmt. In diesem System wurde die Quantität von gebildetem ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Acetylcarnitin (nicht absorbiert durch das Harz) stöchiometrisch in Beziehung gesetzt zu dem Betrag von vorhandenem Carnitin.

Außerdem wird bei dieser Methode zum Entfernen von CoASH aus dem System Natriumtetrathionat (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz) verwendet, von dem keinerlei inhibitorische Effekte auf die Carnitinacetyltransferase ausgehen sollen (59, 80, 84). Andere Autoren widersprechen dieser letztangeführten Behauptung (70). Leider kamen wir mit dieser Methode zu keinen verwertbaren Ergebnissen, da nach unserer Meinung die Trennung von nicht umgesetztem ($1\text{-}^{14}\text{C}$) Acetyl-CoA

durch das Anionen-Austauscher-Harz Dowex 1-X 10 (Cl⁻ 200-400 mesh) nicht effektiv genug war. Auch eine Erhöhung der Dowex-Komponente im System konnte nicht befriedigen. Schon beim Einstellen des pH-Wertes des Harzes nach Vorschrift ergaben sich Schwierigkeiten. Um Fehler unsererseits auszuklammern wurden alle Lösungen neu angesetzt, doch erwies sich die Methode als nicht praktikabel, da mit den ermittelten Standardwerten kein gerader Verlauf der Standardkurve erzielt werden konnte, und außerdem durch die bereits oben erwähnte ungenügende Trennung des nicht umgesetzten (1-¹⁴C) Acetyl-CoA durch das Anionen-Austauscher-Harz ein korrekter Null-Wert nicht gefunden werden konnte.

So verwendeten wir die von PARVIN und PANDE 1976 beschriebene Methode (70, 85, 86), die folgende Nachteile der CEDERBLAD und LINDSTEDT-Methode vermeidet. Diese bestehen in folgenden Punkten:

- a) die Standardkurve zeigt eine begrenzte Linearität mit der Carnitinmenge auf, wenn nicht ein starker Überschuß von Acetyl-CoA verwendet wird.
- b) die Prozedur ist unanwendbar für die Bestimmung von freiem Carnitin in Proben, die kurzkettige Acyl (-) Carnitine enthalten - wie es oft in biologischen Extrakten vorkommt - wegen der Umkehrbarkeit der Carnitin-Acetyltransferase-Reaktion.

Außerdem beschreiben die Autoren in der Benutzung einer Holzkohlenmischung eine überzeugendere und schnellere Trennung von Acetyl-Carnitin von Acetyl-CoA.

Wir änderten den Ansatz geringfügig (70):

2.2.3 Radioisotopische Methode zur Bestimmung von Carnitin (PARVIN und PANDE, 70)

Die Methode basiert auf der Conversion des radioaktiven Acetyl-CoA in Acetyl (-) Carnitin in der Anwesenheit von Carnitinacetyltransferase und oxidiertem NEM (N-ethylmaleimid). Bei dieser Reaktionsbedingung läuft die Reaktion praktisch vollständig ab, so daß eine lineare Standardkurve über einen weiten Konzentrationsbereich erhalten wird. Die schnelle Trennung von ($1\text{-}^{14}\text{C}$) Acetyl (-) Carnitin und nicht umgesetztem ($1\text{-}^{14}\text{C}$) Acetyl-CoA wird durch selektive Adsorption des letzteren auf Holzkohle in der Gegenwart von Säure und Äthanol erreicht.

Arbeitsgang und Materialien:

Das Reaktionssystem enthält 0,20 ml Tris HCl (1M, pH 8,0 - Boehringer Mannheim); 0,025 ml NEM (N-ethylmaleimid - Fluka AG Buchs SG, Schweiz, 0,5mM NEM $\rightarrow$ 6,25 mg NEM in 100 ml 0,1M Kaliumphosphatpuffer pH 7,6); 0,025 ml Acetyl-CoA (Boehringer Mannheim, 14 C - Acetyl-CoA - spezifische Aktivität 49,8 mCi/mmol von New England Nuclear, Boston - 50 mg Ac-CoA gelöst in 3,8 ml H_2O , dazu 0,005 mCi Ac-CoA in 0,25 ml H_2O); 0,05 ml EDTA (Merck, Darmstadt Neutral EDTA 50 mM); 2,0 ml Carnitinstandards von 1-500 nmol (-)Carnitin (D-L-Carnitinchlorid von Serva Feinbiochemica, Heidelberg) beziehungsweise 0,1 ml Spermaproben und 1,9 ml Aqua destilata; 0,01 ml Carnitinacetyltransferase (Boehringer Mannheim - 1 mg/ml).

Man läßt das System bei 25 Grad Celsius circa fünf Minuten reagieren. Dann wird 0,6 ml einer Holzkohlenmischung zugegeben. Die Holzkohlenmischung, die für

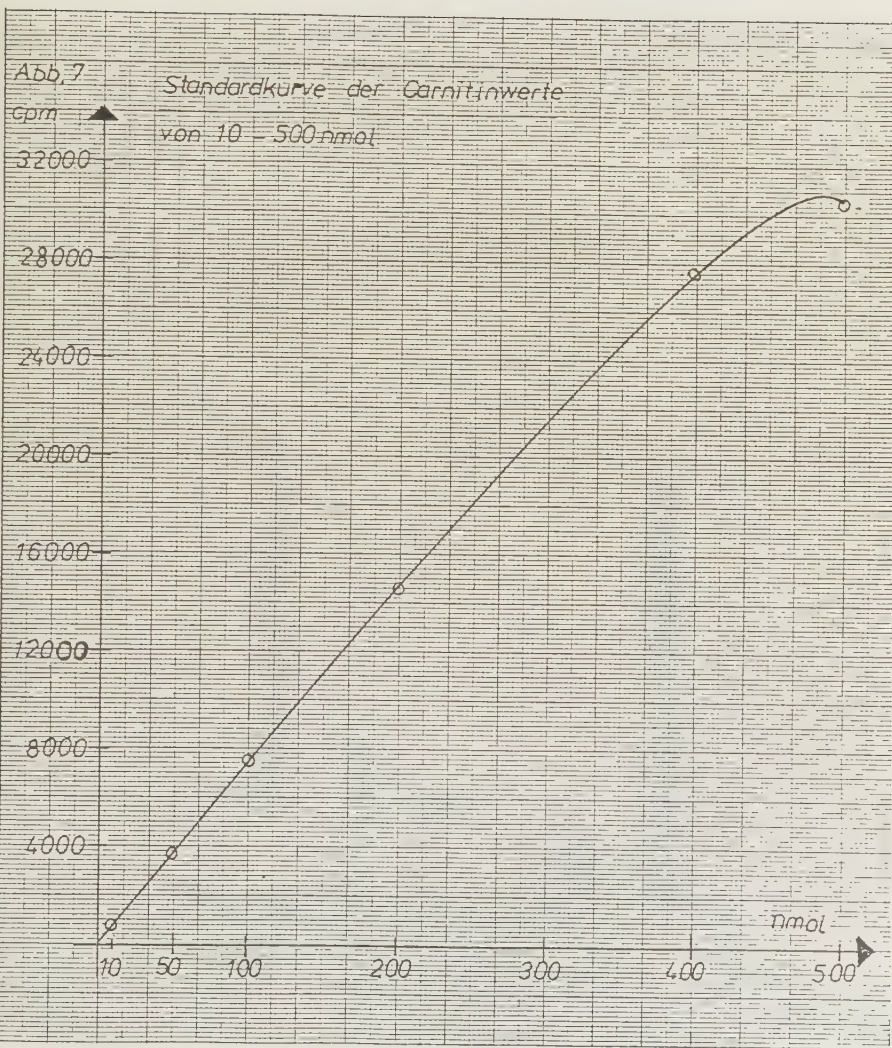
circa 200 Proben ausreicht, wird hergestellt durch das Lösen von 8 g Holzkohle (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) in einer Mischung von 109 ml Äthanol (Merck Darmstadt), 2,5 ml 14M Orthophosphorsäure (Merck Darmstadt) und 8,5 ml Aqua destilata. Während der Verwendung ist die Lösung mit Hilfe eines Magnetrührers zu durchwirbeln. Nach Zugabe der Holzkohlenmischung werden die Proben im Eisbad aufbewahrt. Der Inhalt wird dreimal in Zehnminutenintervallen durchmischt. Dann werden die Proben fünf Minuten bei 5000 U/min. zentrifugiert, um die Holzkohle zu sedimentieren. Eine 0,4 ml-Portion des klaren Überstandes wird in ein Zählröhrchen überführt, das 0,5 ml Scintillationsflüssigkeit (Aquasol) enthält und kurz geschwenkt. Danach erfolgt eine zwanzigminütige Messung im Scintillationszähler.

Die Menge von gebildetem ($1-^{14}\text{C}$) Acetylcarnitin (nicht adsorbiert durch die Holzkohlenmischung - gemessen in counts/minute) wird in Beziehung gesetzt zu dem Betrag von vorhandenem (-) Carnitin.

Die Standardkurve von 1 bis 500 nmol ergab folgendes Bild:

Zu Abbildung 7

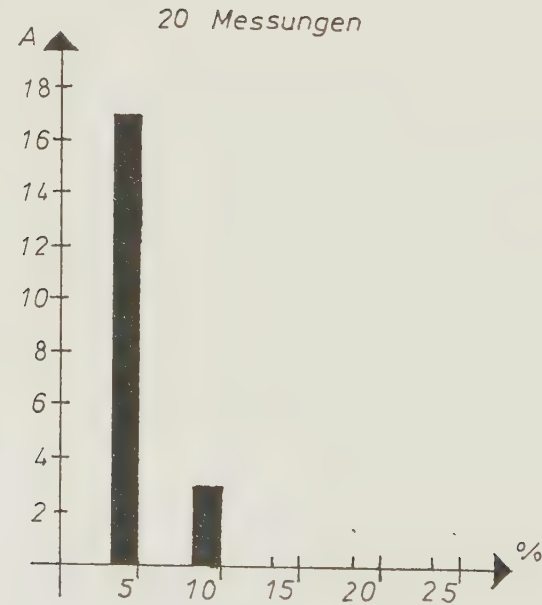
Werte:	10 nmol Carnitin	780 cpm
	50 nmol Carnitin	3850 cpm
	100 nmol Carnitin	7840 cpm
	200 nmol Carnitin	14600 cpm
	400 nmol Carnitin	27300 cpm
	500 nmol Carnitin	30500 cpm



Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, ist eine Linearität bis annähernd 350 nmol entsprechend 100 $\mu\text{g/ml}$ gegeben.

Im Vergleich zur DTNB-Methode ergab sich bei der Messung der Carnitinwerte zum Erstellen der Standardkurve keine Abweichung über 10% (siehe Abbildung 8).

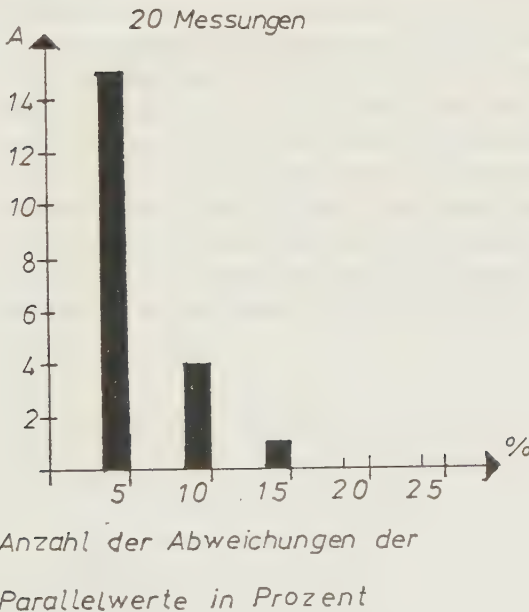
Abb. 8



Anzahl der Abweichungen der
Parallelwerte in Prozent

Auch für die Carnitinbestimmung im Seminalplasma war die Übereinstimmung der Zweitbestimmungen wesentlich günstiger als bei der DTNB-Methode. Es wiesen hier nur 5% der Parallelbestimmungen - gegenüber 51% bei der DTNB-Methode - eine Abweichung von über $\pm 10\%$ auf. Nach unserer Meinung ergibt sich damit eine doch sichtlich höhere Genauigkeit im biologischen Material (siehe Abbildung 9).

Abb. 9



Die Carnitinbestimmung in der Samenflüssigkeit sollte nach Möglichkeit direkt nach der Verflüssigung, zumindest aber innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Gewinnung erfolgen. Messungen nach 60 Minuten ergaben meist niedrigere (bis zu maximal 10%), selten gleichbleibende oder geringfügig erhöhte Carnitinwerte. Zu fast gleichen Ergebnissen kamen wir, wenn das Ejakulat in 0,1 ml-Portionen tiefgefroren wurde und dann in einem Zeitraum von einer Woche bis zu einem Monat nach der beschriebenen Weise an der aufgetauten Probe eine Carnitinmessung durchgeführt wurde.

Im direkten Vergleich zur DTNB-Methode, wobei hier der Mittelwert von Dreifachbestimmungen genommen wurde, blieben die Differenzen im erwarteten Rahmen. 90% der Messungen wiesen Abweichungen von bis zu 10%, 10% der Vergleichswerte eine Abweichung von über 30% auf. Bei diesen Werten handelte es sich um Carnitinmengen von unter $8 \mu\text{g/ml}$, beziehungsweise von über $100 \mu\text{g/ml}$, in einem Bereich also, in dem keine Linearität der Kurve mehr gegeben ist. Unter $8 \mu\text{g/ml}$ ist der Nullwert zu groß, wahrscheinlich durch die Verunreinigung der Substanzen, so daß eine Messung der Carnitinwerte hier nicht mehr erfolgen kann.

3. DISKUSSION

Die von uns aufgezeigte Methode für die Carnitinbestimmung im Ejakulat hat gegenüber bekannten Methoden einige Vorteile. Diese liegen einmal in ihrer größeren Genauigkeit, das heißt in geringeren Abweichungen von Parallelbestimmungen. Somit ist die Aussagefähigkeit der Methode zuverlässiger als die anderer.

Ein Sammeln der Proben nach der Trennung von Acetylcarnitin von Acetyl CoA durch die Holzkohlenmischung ist über mehrere Tage möglich, bevor die Proben im Scintillationszähler gemessen werden. Die Ansätze sollten dann aber im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Ergebnisse werden vom Zählgerät ausgedruckt und engen weitere Fehler, wie sie durch handgeschriebene Aufzeichnungen entstehen können ein. Außerdem zeigt sich eine Zeitersparnis von circa 15 Minuten beim personalgebundenen Arbeiten, das heißt ein kostenintensiver Faktor kann hier abgeschwächt werden. Der Zeitgewinn vergrößert sich mit der Anzahl der Proben. Ein Verfall von Enzymen zeichnet sich bei der Methode deutlicher ab, da immer Eichlösungen mitlaufen und so Fehler, die sich in anderen Methoden langsam einschleichen, hier von vorneherein ausgeklammert werden können.

Die Haltbarkeit der verschiedenen Lösungen ist der der anderen enzymatischen Untersuchungsmethoden gleichzusetzen. Auch liegen die Preise für die benötigten Materialien im Rahmen anderer angewendeter Methoden.

Einen großen Gewinn in der von uns aufgestellten Carnitinbestimmungsmethode sahen wir in dem geringen Mengenbedarf von Ejakulat. Hier ließen sich immer Parallelbestimmungen der Proben durchführen, was die Genauigkeit beziehungsweise die Aussagekraft

der Untersuchungen unterstützte. Bei anderen Methoden mit einem höheren Ejakulatbedarf kam es häufig vor, daß bei der Notwendigkeit mehrerer Untersuchungen im Rahmen der Fertilität und Mikrobiologie nicht mehr genug Sperma für eine Zweitbestimmung vorhanden war. In extremen Fällen, bei geringem Ejakulatvolumen war es sogar mehrfach notwendig, daß Patienten zur Samen-spende zwecks Carnitinbestimmung erneut einbestellt werden mußten.

Ein auf den ersten Blick scheinender Nachteil der aufgezeigten Methode, daß diese keine genaue Aussage über $100 \mu\text{g/ml}$ und unter $8 \mu\text{g/ml}$ zuläßt, stellt keine ernsthafte Begrenzung dar, zudem in der Literatur keinerlei Hinweis über den Aussagewert solcher hoher Carnitinwerte (über $100 \mu\text{g/ml}$) im menschlichen Sperma gefunden wurde. Werte unter $8 \mu\text{g/ml}$ gelten in jedem Fall als pathologisch und könnten höchstens mit zur Unterscheidung von Azoospermie (hier sind manche Carnitinwerte bei Patienten gleich Null) und vasktomierter Patienten (der Carnitinwert ist zwar gering, aber nicht gleich Null) herangezogen werden.

Eine klare Aussage zur Unterscheidung ob beim Patienten eine Azoospermie oder Vasektomie vorliegt, ist wiederum nicht möglich, da die Carnitinwerte von Patienten mit Azoospermie über weite Bereiche bis zu Normalwerten hin schwanken. Andererseits kann wohl der Zustand der Vasektomie in der Anamnese erfragt werden, so daß die Begrenzung der Methode auf die rein wissenschaftliche Anwendung beschränkt bleibt.

Einen begrenzenden Faktor fanden wir jedenfalls nur in der Notwendigkeit eines teuren Flüssigkeits-Scintillationszählers und im Ansammeln von

radioaktivem Abfall und der daraus resultierenden Probleme und Umweltbelastungen.

Im Großen und Ganzen glauben wir neben den bekannten Methoden zur Carnitinbestimmung im Seminalplasma eine weitere - wenn auch nicht in allen Punkten bessere - so doch auf jeden Fall in Bezug auf die Einfachheit und Genauigkeit sichere Methode aufgestellt zu haben.

4. LITERATURVERZEICHNIS

1. FRAENKEL, G. und S. FRIEDMAN
Vitamins And Hormons 15, S. 73ff, 1957
2. PEARSON, D.J. und TUBBS, P.K.
Carnitine And Derivates In Rat-Tissues
Biochem. J. 105, S. 953ff, 1967
3. GULEWITSCH, W. und KRIMBERG, R.
Physiol. Chem. 45, S. 326ff, 1905
4. FRAENKEL, G.
Biol. Bull. 104, S. 359ff, 1953
5. FRITZ, I.B. und K.T.N. YUE
Effects Of Carnitine On Acetyl-CoA Oxidation
By Heart Mitochondria
Am. J. Physiol. 206, S. 531ff, 1964
6. BREMER, J.
Carnitine In Intermediary Metabolism. The
Biosynthesis Of Palmitylcarnitine By
Cell Subfractions
J. Biol. Chem. 238, S. 2774ff, 1963
7. FRITZ, I.B. und K.T.N. YUE
Long-Chain Carnitine Acetyltransferase
And The Role Of Activating Derivates In The
Catalytic Increase Of Fatty Acid Oxidation
Induced By Carnitine
J. Lipid Res. 279, 1963

8. NORUM, K.R.
Palmityl-CoA: Carnitine Palmityltransferase
Purification From Calf Mitochondria And Some
Properties Of The Enzym
Biochem. Biophys. Acta 89, S. 95ff, 1964
9. NORUM, K.R.
Palmityl-CoA: Carnitine Palmityltransferase
Biochem. Biophys. Acta 99, S. 511ff, 1965
10. CHASE, J.F.A.
The Substrate Specificity Of Carnitine
Acetyltransferase
Biochem. J. 104, S. 510ff, 1967
11. FRITZ, I.B.
Carnitine And Its Role In Fatty Acid Metabolism
Adv. Lipid Res. I, S. 285-343, 1963
12. SCHMIDT, B.
Physiologische Chemie für Examenskandidaten
Uni-Taschenbücher 290, S. 139, 1973
13. KARLSON, P.
Kurzlehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 201, 1972
14. BUDDECKE, E.
Grundriß der Biochemie
de Gruyter Berlin, 1970
15. CASILLAS, E.R.
The Distribution Of Carnitine In Male Reproductive
Tissues And Its Effect On Palmitate Oxidation
By Spermatozoal Particles
Biochem. Biophys. Acta 280, S. 545-551, 1972

16. MINASSIAN, E.S. und C. TERNER
Biosynthesis Of Lipids By Human
And Fish Spermatozoa
Physiol. 210, S. 615, 1966

17. PAYNE, E. und C.J. MASTERS
Incorporation Of 14 C-Labelled Fatty Acids
Into The Lipids By Spermatozoa
Life Sciences 7, II, S. 935, 1968

18. MILLS, S.C. und T.W. SCOTT
Metabolism Of Fatty Acids By Testicular
And Ejaculated Ram Spermatozoa
J. Reprod. Fert. 18, S. 367ff, 1969

19. NEILL, A.R. und C.J. MASTERS
Incorporation Of (U-¹⁴ C) Palmitic Acid
The Phospholipide Of Bovine Semen
J. Reprod. Fert. 24, S. 295ff, 1971

20. DAWSON, R.M.C. und T.W. SCOTT
Phospholipid Composition Of Epididymal
Spermatozoa Prepared By Density Gradient
Centrifugation
Nature, Lond. 202, S. 292ff, 1964

21. HORNE, D.W. und H.P. BROQUIST
J. Biol. Chem. 248, S. 2170ff, 1973

22. TAMPHAICHITR, V. und H.P. BROQUIST
J. Biol. Chem. 248, S. 2176ff, 1973

23. BROQUIST, H.P. und V. TAMPHAICHITR
Fed. Proc. 32, Seite 3743ff, 1973

24. MARQUIS, N.R. und I.B. FRITZ
Effects Of Testosterone On The
Distribution Of Carnitine, Acetylcarnitine
And Carnitinacetyltransferase In Tissues
Of The Reproductive System Of The Male Rat
J. Biol. Chem. 240, S. 2197ff, 1965
25. FRITZ, I.B.
Am. J. Physiol. 206, S. 1217ff, 1964
26. ERFLE, J.D., FISHER, L.J. und F. SAUER
J. Dairy Science 53, S. 468ff, 1970
27. CHALLONER, D.R., MANDELBAUM, I. und W. ELLIOT
J. Lab. Clin. Med. 77, S. 616ff, 1971
28. CHALLONER, D.R. und H.G. PROLS
J. Clin. Invest. 51, S. 2071ff, 1972
29. LAWRENCE, M., LEWIN, Ph., D., RIRKA BEER, M.Sc.
und B. LUNENFELD M.D.
Epididymis And Seminal Vesicle As Sources
Of Carnitine In Human Seminal Fluid:
The Clinical Significance Of The
Carnitine Concentration In Human Seminal Fluid
Fertility And Sterility Vol. 27 Nr. 1, 1976
30. WETTERAUER, U. und H.J. HEITE
Der Carnitin-Gehalt im Sperma - ein Parameter
für die Nebenhodenfunktion
Aktuelle Dermatologie 3, 1976
31. WALDEYER, A. und A. MAYET
Anatomie des Menschen I
Walter de Gruyter Berlin, New York, S. 296, 1976

32. MANN, T.
Studies On The Metabolism Of Semen
Biochem. J., Vol. 40, S. 481ff, 1946
33. LUNDQUIST, F.
Aspects Of Biochemistry Of Human Semen
Acta Phys. Scand., 19 Suppl, S. 66ff, 1952
34. SCHÜLLER, W.
Zur Kenntnis der sauren Phosphatase
im Spermaplasma
Inaug. Dissertationen, Freiburg 1975
35. MANN, T.
Chemical Methods In The Analysis
In Evaluation Of Semen
Proc. Soc. Stud. Fertil. 3, 1951
36. HEITE, H.J. und U. WETTERAUER
Über den ungewöhnlich hohen Y-GT Gehalt
im Sperma und seine diagnostische Bedeutung
Hautarzt
37. FRAENKEL, G., PETERSON, R.N., DAVIS, J.E. und
M. FREUND
Glycerolphosphorylcholine And Carnitine
In Normal Human Semen And In Postvasectomy Semen:
Differences In Concentrations
Fertility And Sterility, Vol. 25, No. 1, 1974
38. ABDEL KADER, M.M. und G. WOLF
Recent Research On Carnitine.
Its Relation To Lipid Metabolism
The MIT Press Cambridge Ma, S. 147ff, 1965

39. MARQUIS, N.R. und I.B. FRITZ
The Distribution Of Carnitine, Acetylcarnitine
And Carnitine-Acetyltransferase In Rat Tissues
J. Biol. Chem., Vol. 240, No. 5, S. 2193ff, 1965
40. ORGEBIN-CHRIST, M.
Biol. Reprod., 1, S. 155ff, 1969
41. HAMILTON, D.W.
Excerpta Medica Monograph, Reproductive Biology
(BALIN, H. und S. GLASSER ed) S. 268-337
Excerpta Medica, Amsterdam, 1972
42. WAITES, G.M.H. und B.P. SETCHELL
Advan. Reprod. Physiol. 4, S. 1-63, 1969
43. HORAN, A.H. und J.M. BREDFORD
J. Reprod. Fert. 30, S. 417ff, 1972
44. BROOKS, D.E., HAMILTON, D.W. und A.H. MALLEK
Carnitine And Glycerylphosphorylcholine
In The Reproductive Tract Of The Male Rat
J. Reprod. Fert. 36, S. 141ff, 1974
45. CASILLAS, E.R.
Accumulation Of Carnitine By Bovine Spermatozoa
During Maturation In The Epididymis
J. Biol. Chem. Vol. 248, S. 8227ff, 1973
46. REID, B.L. und K.W. CLELAND
Australian J. Zool. 5, S. 223ff, 1957
47. CLERMONT, Y. und B. PEREY
Am. J. Anat. 100, S. 241ff, 1957

48. ANTLIFF, H.R. und W.C. YOUNG
Endocrinology 61, S. 121ff, 1957
49. NELSON, W.O.
J. Urol. 69, S. 325ff, 1953
50. CLEGG, E.J.
J. Endocrinology 27, S. 241ff, 1963
51. BROOKS, D.E. und D.W. HAMILTON
Carnitine And Glycerylphosphorylcholine
In The Rat Epididymis
Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biol. 32,
S. 309ff, 1973
52. MANN, T. und V. PARSONS
Nature, 160, S. 294ff, 1947
53. HUMPHREY, G.F. und T. MANN
Nature, 161, S. 352ff, 1948
54. MOORE, C.R.
J. Urol., 47, S. 31ff, 1942
55. BEACH, F.A. und W.H. WESTBROOK
Morphological And Behavioural Effects Of An
"Antiandrogen" In Male Rats
J. Endocrinology 42, S. 379ff, 1968
56. LEWIN, L.M., PESHIN, A. und B. SKLARZ
A Gas Chromatographic Assay For Carnitine
Analyt. Biochem. 68, S. 531ff, Academic Press
New York, 1975

57. PEARSON, D.J., TUBBS, P.K. und F.A. CHASE
in: Methoden der enzymatischen Analyse
H.U. Bergemeyer Hrsg.
3. Aufl., S. 1710ff, 1974
58. WAKIL, S.J. und G. HÜBSCHER
J. Biol. Chem. 235, S. 1554ff, 1960
59. FRITZ, I.B., SCHULZ, S.K. und P.A. SRERE
Properties Of Partially Purified
Carnitine-Acetyltransferase
J. Biol. Chem. 236, S. 2509ff, 1963
60. MARQUIS, N.R., und I.B. FRITZ
J. Lipid Res. 5, S. 134ff, 1964
61. DAWSON, R.M.C. und W. ROLANDS
Glycerolphosphorylcholine In The
Male Reproductive Organs
Of Rats And Guinea Pigs
Q.J. Exp. Physiol. 44, S. 26ff, 1959
62. PEARSON, D.J., TUBBS, P.K. und F.A. CHASE
Methods In Enzymology
Lowenstein, J.M. ed
Academic Press New York, S. 612ff, 1969
63. TUBBS, P.K. und P.B. GARLAND
Vol. XIII, 1972
64. SHEPHERD, D., YATES, D.W. und P.B. GARLAND
Biochem. J. 97, 38c, 1965

65. MC GARRY, J.D. und D.W. FOSTER
An Improved And Simplified Radioisotopic Assay
For The Determination Of Free And Esterified
Carnitine
J. Lipid Res. Vol. 17, S. 277ff, 1976
66. CEDERBLAD, G. und S. LINDSTEDT
Method For The Determination Of Carnitine
In The Picomole Range
Clin. Chem. Acta 37, S. 235ff, 1972
67. BOHMER, T., RYDNING, A. und H.E. SOLBERG
Carnitine Levels In Human Serum In Health
And Disease
Clin. Chem. Acta 57, S. 55ff, 1974
68. BREMER, J.
Carnitine In Intermediary Metabolism
J. Biol. Chem. 237, S. 2223ff, 1962
69. STADTMAN, E.R.
Preparation And Assay Of Acylcoenzym A
And Other Thiol Esters, Use Of Hydroxylamine
Methods Enzymol. 3, S. 931ff, 1957
70. PARVIN, R. und SHRI V. PANDE
Microdetermination Of Carnitine And
Carnitine-Acetyltransferase Activity
Analytical Biochem., Academic Press
New York, S. 190ff, 1976
71. TRAVASSOS, L.R. und CELUTA O. SALES
Microbiological Assay Of Carnitine
Analytical Biochem. 58, S. 485ff, 1974

72. TRAVASSOS, L.R. und A. CURY
Annu. Rev. Microbiol. 25, S. 49ff, 1971
73. MIRANDA, M., PICARD, I, CRUZ, W.B. und A.F.F. RIBEIRO
An. Acad. Bras. Ciencias 39, S. 429ff, 1967
74. TRAVASSOS, L.R., SUASSUNA, E.N., CURY, A., HAUSMANN, R.L. und M. MIRANDA
Am. Microbiol. (Rio de Janeiro) 9, Seite 465ff, 1961
75. WALL, J.S., CHRISTIANSON, D.D., DIMLER, R.J. und F.R. SENTI
Anal. Chem. 32, S. 870ff, 1960
76. APPLETON, H.D., LADU, B.N.Jr., LEVY, B.B., STECK, J.M. und B.B. BRODIE
J. Biol. Chem. 205, S. 803ff, 1953
77. MARQUIS, N.R. und I.B. FRITZ
Enzymological Determination Of Free Carnitine Concentrations In Rat Tissues
J. Lipid Res. Vol. 5, S. 184ff, 1966
78. CHILDRESS, C.C., SACKTER, B. und D.R. TRAYNOR
J. Biol. Chem. 242, S. 754ff, 1966
79. CASILLAS, E.R. und R.W. NEWBURGH
Biochem. Biophys. Acta 134, S. 566ff, 1969
90. SKREDE, S. und J. BREMER
The Compartmentation Of CoA And Fatty Acid Activating Enzyms In Rat Liver Mitochondria
Eur. J. Biochem. 14, S. 465ff, 1970

81. DI MAURO, S., SCOTT, C., PENN, A.S. und
I.P. ROWLAND
Serum Carnitine
Arch. Neurol. 28, S. 186ff, 1973
82. FRAENKEL, G.
Methods In Enzymology
COLOWICK, S.P. und N.O. KAPLAN eds
Vol. 3, S. 662ff, Academic Press New York, 1957
83. CHRISTIANSON, D.D., WALL, J.S., CAVINS, J.F.
und R.J. DIMLER
J. Chromatog. 10, S. 432ff, 1963
84. SKREDE, S., BREMER, J. und L. ELDJAIN
The Effect Of Disulphides On
Mitochondrial Oxidations
Biochem. J. 95, S. 838ff, 1965
85. PANDE, S.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, S. 983ff, 1975
86. PANDE, S. und R. PARVIN
J. Biol. Chem. 251, S. 6693ff, 1976

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Morsches für die
Überlassung des Themas, für die Unterstützung
bei der Durchführung der Versuche und die
freundliche Beratung.

LEBENS LAUF

- 1.12.1950 in Heidenau/Dresden geboren als Sohn
des Hoteliers Kurt Rathe und seiner
Ehefrau Ingeburg, geb. Herrmann
- 1957 - 1959 Grundschule in Dresden
- 1959 - 1961 Grundschule in Merzig/Saar
- 1961 - 1964 Gymnasium: Realgymnasium Merzig/Saar
- 1964 Gymnasium: Dietrich Bonhoeffer-Gymnasium
Ahlhorn/Oldenburg
- 1964 - 1970 Gymnasium: Goethe-Gymnasium Wetzlar
- 15.6.1970 Reifeprüfung am Goethe-Gymnasium
in Wetzlar
- 1970 - 1972 Grundwehrdienst
- 1972 - 1975 Studium der Haushalts- und Ernährungs-
wissenschaften an der
Justus Liebig-Universität Gießen
- 7.8.1975 Immatrikulation an der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
im Fach Zahnmedizin
- 6.10.1977 Zahnärztliche Vorprüfung
- 20.6.1980 Zahnärztliche Prüfung
- 1980 - 1981 Wissenschaftlicher Angestellter am
Klinikum der Justus Liebig-Universität
in Gießen, Abteilung für Parodontologie
- 1.9.1981 Einstellung als Assistenz-Zahnarzt
in freier Praxis, Gießen

